

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



The role of chromosome compaction in the establishment of cell fate

Marta Isabel Seita Afonso

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Versão Pública

Dissertação orientada por:
Catarina Homem e Rui Gomes

2019

Abstract

Equal segregation of genetic material during cellular division is a process that must be reliable otherwise it could cause loss of genome integrity or genomic instability. For this to happen, chromosome segregation must be highly regulated. However, the mechanism by which chromosome packaging is controlled during mitosis is still not fully understood. Nevertheless, histones and condensin complexes are described to have a role in this compaction. Histones organize the DNA in units called nucleosomes and the acetylation of their tails destabilizes chromatin fibers, while the condensin complex is involved in the condensation and segregation of chromosomes.

To understand how chromosome compaction occurs and how chromosomes are distributed into different cells is extremely important to the determination of cell fate. Here, we address these questions by studying the stem cells of *Drosophila's* developing brain, the neuroblasts (NBs). Each NB divides asymmetrically, self-renewing and originating a more committed cell. Using a live imaging approach, we studied the levels of chromosome compaction during NBs anaphase and their possible association with different cell fates. For this, we measured the levels of Histone 2A variant and Barren (a condensin I subunit) associated with chromosomes during NBs asymmetric division. Our results show that during NBs' anaphase the chromosomes that will be segregated to the differentiated cell, tend to be more condensed since the levels of the compaction proteins are higher. Interestingly, this tendency is visible since the beginning of anaphase and seems to be maintained until the chromosomes start to decondense.

Taken together, our findings suggest that there is asymmetric distribution of compaction proteins during NBs' division and that this asymmetric compaction of chromosomes is established very early in anaphase.

Keywords: Chromosomes, asymmetric division, fate, Condensin I, His2Av.

Resumo

O desenvolvimento de um organismo multicelular é um processo complexo e extremamente controlado. De maneira a formar um organismo completamente funcional é necessária a regulação de vários processos como a proliferação e diferenciação celular tanto temporal como espacialmente.

As células estaminais são muito importantes no desenvolvimento de um organismo. Este tipo celular tem a capacidade de produzir uma enorme quantidade e variedade de células, que são encontradas num organismo completamente desenvolvido. A regulação da divisão e diferenciação das células estaminais é essencial para evitar uma proliferação descontrolada que pode levar à formação de tumores.

A divisão de uma célula estaminal durante o desenvolvimento de um organismo implica dois tipos diferentes de divisões: simétricas e assimétricas. As divisões simétricas originam duas células estaminais iguais e ocorrem para compensar a perda de células estaminais na fase adulta. Por outro lado, as divisões assimétricas são as que predominam durante o desenvolvimento. Neste tipo de divisões são formadas duas células filha diferentes: uma que mantém a sua capacidade estaminal e outra comprometida para diferenciar. A segregação equivalente do material genético durante a divisão celular é uma característica fundamental para a correta formação de um organismo saudável. Este processo tem de ser altamente controlado para prevenir distúrbios e instabilidade genómica.

A regulação das divisões assimétricas é extremamente importante para manter o equilíbrio sobre a formação dos vários tipos de células durante o desenvolvimento. Neste tipo de divisões, o material genético que é segregado é o mesmo, no entanto, as células-filhas adquirem destinos diferentes. A divisão assimétrica de uma célula estaminal em duas células-filhas com diferentes destinos implica uma mudança na organização da cromatina, epigenética e transcrito entre ambas as células.

A cromatina é responsável por providenciar a informação necessária para a expressão genética e determinação da identidade celular. No entanto, mudanças na epigenética também têm sido associadas à diferenciação celular. Algumas modificações epigenéticas mantêm-se durante a divisão celular e são responsáveis por transmitir informações reguladoras às células filhas.

Existe uma forte relação entre o ciclo celular e os mecanismos necessários para a modificação da identidade celular. O ciclo celular encontra-se dividido em duas fases principais: a interfase e a mitose. Durante a interfase, ocorre a replicação do DNA e a acumulação de energia e proteínas necessárias para a divisão celular. A mitose baseia-se na divisão do material genético em duas células filhas para isto ocorrem várias modificações na célula, como a condensação dos cromossomas e posteriormente a migração dos cromátídeos irmãos para polos opostos de maneira a formar dois núcleos individuais.

Os mecanismos que regulam a condensação dos cromossomas não estão completamente esclarecidos. As células estaminais apresentam uma cromatina aberta e dispersa no núcleo que mostrou ser necessária para a manutenção da sua pluripotência.

Durante a diferenciação a expressão génica é alterada, os genes que mantêm a pluripotência da célula são silenciados, enquanto que os genes específicos para a linhagem e funções mais específicas são expressos. Nas células neuro-estaminais, à medida que a célula se torna mais diferenciada o genoma torna-se mais compacto o que limita o acesso da maquinaria e transcrição a todo o genoma como uma célula estaminal. Assim, durante a divisão assimétrica de uma célula estaminal, o rearranjo da cromatina para um estado mais compacto é necessário para restringir o potencial de uma das células filhas para que esta inicie a diferenciação. Para isto, ocorrem mudanças na expressão génica. As alterações na expressão génica podem ser causadas por modificações das histonas (acetilação, metilação, entre outras), metilação do DNA, ligação de proteínas ao DNA (como as condensinas) e ainda por complexos remodeladores da cromatina.

As Histonas são proteínas responsáveis pela organização do DNA em unidades designadas de nucleossomas. A substituição das histonas por variantes altera as propriedades dos nucleossomas tornando-os mais ou menos suscetíveis a modificações das histonas o que por sua vez vai condicionar a expressão génica. A histona com mais variantes conhecidas é a His2A. A conservação entre as variantes da His2A em vários organismos é maior do que da canónica His2A. A variante His2A.Z é a mais

conservada entre organismos eucariotas e tem sido associada a promotores de genes tanto ativos como inativos. Durante o desenvolvimento embrionário do ratinho, a variante His2A.Z inicia a sua expressão em células que estão a iniciar a sua diferenciação. A perda desta variante causa maiores danos na diferenciação celular do que na renovação das células estaminais. Além disso, a ausência da His2A.Z causa instabilidade e defeitos na segregação dos cromossomas durante a mitose.

Outro grupo de proteínas associadas à correta condensação e segregação dos cromossomas são os complexos de condensinas. Estes complexos ligam-se a regiões regulatórias durante a interfase e a mitose. Assim, as condensinas podem ter um grande impacto na organização dos nucleossomas e na expressão génica tanto por uma interferência passiva ou por mudanças diretas na estrutura do DNA.

A maioria dos eucariotas tem dois complexos de condensinas constituídos com diferentes subunidades reguladoras. Ambos os complexos de proteínas têm diferentes funções. Enquanto que, a condensina I se associa à cromatina depois do *Nuclear Envelope Break Down (NEBD)* e é importante para a progressão normal da mitose e da segregação dos cromátídeos-irmãos a condensina II está presente no núcleo durante todo o ciclo celular e é necessária para a formação inicial do eixo dos cromossomas. Entre as subunidades reguladoras, a fosforilação das subunidades kleisinas (CAP-H e CAP-H2, respetivamente) é responsável pela ativação e recrutamento dos complexos de condensinas para os cromossomas.

O conhecimento de como a compactação dos cromossomas ocorre e como é que estes são distribuídos para diferentes células é extremamente importante para perceber a determinação do destino celular.

Nesta tese procuramos responder a estas questões com o estudo das células estaminais do cérebro da *Drosophila*, os Neuroblastos (NBs). Durante o desenvolvimento, cada NB divide-se assimetricamente e tem a capacidade de se autorrenovar e originar uma célula mais diferenciada.

A contribuição dos diferentes complexos de condensinas para a mitose em *Drosophila* não está completamente esclarecida. Durante o desenvolvimento, a condensina I tem sido associada à condensação dos cromossomas. A subunidade Barren/CAP-H mostrou ser essencial para a integridade da heterocromatina durante a mitose nos NBs.

Através da utilização de uma técnica de microscopia em tempo real, abordámos este tema com a análise dos níveis de compactação dos cromossomas durante a anafase dos NBs e qual a sua possível associação com a determinação de diferentes destinos celulares.

Com este objetivo, medimos os níveis de intensidade da variante Histona 2A (homóloga da His2A.Z) e do *Barren* (subunidade da condensina I) associados aos cromossomas durante a divisão assimétrica dos NBs.

Os nossos resultados indicam que durante a anafase dos NBs os cromátídeos irmãos que vão ser segregados para a célula mais diferenciada tendem a estar num estado mais condensado. Nestes resultados, os níveis de His2Av e *Barren* aparentam estar mais elevados no polo dos cromossomas que está a ser herdado pela célula diferenciada durante a anafase dos NBs tipo II.

Para além disso, os nossos resultados indicam que esta diferença na condensação é detetável desde o início da separação dos cromátídeos irmãos e mantém-se até ao fim da anafase dos NBs.

Concluindo, os nossos resultados sugerem que existe uma distribuição assimétrica de proteínas envolvidas na condensação da cromatina durante a divisão dos NBs e ainda que esta assimetria na condensação já se encontra estabelecida no início da anafase.

Palavras-chave: cromossomas, divisão assimétrica, destino, condensina I, His2Av